

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

**特開平10-243786**

(43)公開日 平成10年(1998)9月14日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I		
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
C07H 21/04		C07H 21/04		B
C12N 1/21		C12N 1/21		
9/04		9/04		D
C12Q 1/32		C12Q 1/32		
	審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 5 頁) 最終頁に統く			

(21)出願番号 特願平9-61727

(71)出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(22)出願日 平成9年(1997)3月3日

(72)発明者 早出 広司

東京都目黒区南1丁目13番16号

特許法第30条第1項適用申請あり 平成8年9月5日  
社団法人日本生物工学会発行の「平成8年度 日本生物  
工学会大会講演要旨集」に発表

(54)【発明の名称】改変型グルコース脱水素酵素

(57)【要約】

【構成】 大腸菌エシエリヒア・コリ (以下E.coli) 由  
来のビロロキノリンキノン(以下PQQ) を捕酵素とするグ  
ルコース脱水素酵素 (以下GDH) の775番目のヒスチ  
ジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チ  
ロシン、またはリジンから選択されるアミノ酸残基で置  
換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子に基  
づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質。

【効果】 改変型PQQGDHは基質特異性に優れ、グルコ  
ースに特異的に作用することから臨床検査や食品分析など  
におけるグルコースの定量に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌エシエリヒア・コリ(以下E.coli)由来のビロロキノリンキノン(以下PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(以下GOD)の772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Pheの775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQDH酵素蛋白質をコードする遺伝子又は当該遺伝子を含むプラスミド。

【請求項2】 特許請求の範囲第1項記載の改変型PQQDH構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQDH酵素蛋白質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は大腸菌エシエリヒア・コリ(以下E.coli)由来のビロロキノリンキノン(以下PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(以下GOD)の特定のアミノ酸残基を人為的に他のアミノ酸残基で置換した改変型PQQDHに関するものであり、より詳細にはE.coli由来のPQQDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Pheの775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQDH酵素蛋白質をコードする遺伝子又は当該遺伝子を含むプラスミド、および改変型PQQDHの構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQDH酵素蛋白質に関し、かかる酵素は臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 グルコースは血液中に存在し、糖尿病の重要なマーカーとして利用されている。また、微生物を用いる発酵生産においても微生物の増殖基質となるグルコースの定量がプロセスマニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(以下GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(以下G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法では発色反応系に導くためにグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を触媒するカタラーゼあるいはペーオキシダーゼを分析系に添加する必要があった。またGODを用いるペーオキシダーゼの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酸素濃度によって計測される値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDH分光学的手法に基づくグルコース定量用に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 これにまでのグルコ-

ス酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQDHの応用が注目されている。PQQDHは補酵素結合型の酵素であり、また酸素を電子受容体としないことから、グルコースセンサーの認識分子をはじめとして、分析分野への応用が期待されている。特にE.coli由来のビロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素PQQDHはその構造遺伝子が知られており(A.M.Cleaton-Jansen et al., J.Bacteriol.(1990) 172, 6308-6315)、また熱安定性の点で改良が可能なことが指摘されている(E.Sode et al., FEBS Lett.(1995) 384, 325-327)ことから、応用が期待されている。しかし、E.coli由来PQQDHはグルコース以外の糖とも反応することがある(Ameyama et al., Agric.Biol.Chem.(1986) 50, 49-57)、基質特異性の点で問題があった。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者はこのような従来のPQQDHを改良して臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQDHの開発に観意研究を行なった。E.coli由来のPQQDHの変異を導入した酵素のうち基質特異性のきわめて高い酵素をえることに成功した。即ち、E.coli由来のPQQDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Pheの775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQDH酵素蛋白質をコードする遺伝子および改変型PQQDHの構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQDH酵素蛋白質はグルコース以外の糖とはほとんど反応せず、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選択性の測定

30 に応用できる。改変する部位として775番目のヒスチジンに着目した理由として次の点が挙げられる。これまでGluconobacter oxydans(グルコノバクテリオキシダンス; 以下G.oxydans)由来PQQDHにおいてその構造遺伝子の778番目のヒスチジン残基がアスパラギン残基に自然変異した変異酵素の基質特異性が天然型のG.oxydans由来PQQDHの基質特異性に比べて低くなり、グルコース以外の糖との反応性が高くなつたという報告があった(A.M.Cleaton-Jansen et al., Mol.Gen.Genet.(1991) 229, 206-212)。したがつてこの部位はG.oxydans由

40 来PQQDHの基質の認識において重要な役割をになつていると考えられた。一方、G.oxydansの787番目におけるヒスチジン残基はE.coli由来PQQDHにおいては775番目のアミノ酸残基に相当し、G.oxydans由来PQQDHと同様にヒスチジン残基である(G.E.Cozier and C.Anthonio, Biochem.J.(1995) 312, 679-685)。しかし、G.oxydans由来PQQDHがグルコース以外の糖とはほとんど反応しないのに対し(Ameyama et al., Agric.Biol.Chem.(1981) 45, 851-861)、E.coli由来PQQDHはその他の糖とも反応する。このことから、E.coli由来PQQDHの775番目におけるヒスチジン残基の基質特異性の役割はG.

3

*oxydans* 由来 PQQGDH の 7 7 8 番目のヒスチジン残基の役割とは異なっていると考えられた。したがって、*E. coli* 由来 PQQGDH の 7 7 5 番目のヒスチジン残基を他のアミノ酸に置換することによって引き起こされる酵素の性質の変化はまったく予知できるものではなかった。本発明に示すように、*E. coli* 由来 PQQGDH の 7 7 5 番目のアミノ酸残基をアスパラギン残基に置換したところ、改変型 PQQGDH の基質特異性は高まり、*G. oxydans* 由来 PQQGDHにおいてみられた変異の効果とは全く反対の効果であった。

【0005】改変型 PQQGDH の構造遺伝子  
本改変型酵素の構造遺伝子は従来報告されている *E. coli* 由来 PQQGDH の 7 7 2 番目から 7 7 8 番目のアミノ酸配列 -Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe- の 7 7 5 番目のヒスチジン残基をコードする塩基配列がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することによって当該遺伝子を構築した。これらを各々、H77S、H77D、H77S、H77Y および H77K と命名した。

#### 【0006】改変型 PQQGDH の製造方法

*E. coli* 由来 PQQGDH の 7 7 2 番目から 7 7 8 番目のアミノ酸配列 -Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe- の 7 7 5 番目のヒスチジン残基がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型 PQQGDH 酵素蛋白質の構造遺伝子を遺伝子発現用のベクタープラスマドに挿入し、これを *E. coli* に形質転換した後、形質転換体を培養する。培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、膜画分を得る。得られた膜画分を界面活性剤の存在下で攪拌し、可溶化し可溶化膜画分を得る。こうして得た可溶化膜画分を例えればイオン交換クロマトグラフィーにより精製することにより、改変型 PQQGDH を調製する。

#### 【0007】基質特異性

*E. coli* 由来 PQQGDH の 7 7 2 番目から 7 7 8 番目のアミノ酸配列 -Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe- の 7 7 5 番目のヒスチジン残基がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型 PQQGDH 酵素蛋白質をコードする遺伝子に基づき生産される改変型 PQQGDH 酵素蛋白質は基質特異性において従来報告されている *E. coli* 由来 PQQGDH とは異なる。グルコースに対する活性を 100 としての各種糖類に対する相対活性を末尾表 1 に示す。これらの改変型 PQQGDH はグルコース以外の糖とはほとんど反応しない。

#### 【0008】

【発明の効果】改変型 PQQGDH はグルコースと特異的に反応することから、グルコースの高感度かつ高選択性の酵素定量法に有用である。ひいては本酵素を用いるグルコースセンサーの開発に利用できる。

#### 【0009】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0010】実施例 1

改変型 PQQGDH 遺伝子の構築  
構造既知の *E. coli* 由来 PQQGDH の構造遺伝子をもとに常法に従って部位特異的変異法により 7 7 5 番目のヒスチジン残基をコードする塩基配列をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジン残基をコードする塩基配列に置換した。まず、ベクタープラスマド pKF18k (宝酒造社) に *E. coli* DH5 $\alpha$  由来 PQQGDH の構造遺伝子 (K. Sode and H. Sano. Biotechnol. Lett. (1994) 16, 455-460) の一部である Aval-HindIII 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造社製 Maxbin-Express Km キットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化した末端表 2 に示すターゲットプライマー 5 pmol を全体 (20  $\mu$ l) の 1/10 倍の同キットのアーニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本錠にした。なお、この末端表 2 に示したターゲットプライマーは当該遺伝子の相補鎖に相当する塩基配列を有し、3' 側の CGT-3' から 5' 側の 5'-AMA までが 7 7 2 番目の Ala から 7 7 8 番目の Phe までのコドンの相補鎖である。セレクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間水浴に置き、プライマーをアーニーリングさせた。これに 3  $\mu$ l の同キットエクステンションバッファー、1  $\mu$ l の T4 DNA リガーゼ、1  $\mu$ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5  $\mu$ l の滅菌水を加えて相補鎖を作成した。これを DNA のミスマッチ修復能欠損である *E. coli* MTH11-18 mtlS に形質転換し、一晩振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。次に、ここから抽出したプラスミドを *E. coli* MV184 に形質転換した。以上の操作により得られた *E. coli* MV184 のコニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を天然型 PQQGDH の構造遺伝子の Aval-HindIII 断片と入れ替え、改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。

#### 【0011】実施例 2

改変型酵素の生産  
変異を含む酵素の構造遺伝子を *E. coli* 用の発現ベクターである pTrc99A (ファルマシア社) のマルチクロニンゲサイドに挿入し、構築されたプラスミドを PQQGDH 生産能を失した *E. coli* PP2418 株 (AM. Cleton-Jansen et al.

した。これを例えれば1%パクトリブト、0.5%酵母エキス、0.5%NaClから成るL培地で形質転換体を培養する。培養には10lの桶上フーメンター-KMJ-10C-FPM111(三ツツバイオシステム社製)を用いた。450mlのL培地(アンビシン50μg/ml、クロラムフェニコール30μg/ml含有)で坂口フラスコを用い、37°Cで一晩振とう培養した菌体をフーメンター中の、10mM MgCl<sub>2</sub>、500μMPQQを含む7lのL培地に植菌した。培養開始後約2時間でイソプロピルチオガラクトシドを最終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離(5000×g、10分、4°C)で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄する。集簇した菌体をフレンチプレスで破砕し、遠心分離(10000×g、15分、4°C)で未破砕の菌体を除去した。これの上清を超遠心分離(160000×g(40000p.m.)、90分、4°C)し、膜画分を得た。これに0.1%(w/v)トライトンX-100 5mM MgCl<sub>2</sub>、10mMリン酸緩衝液 pH 7.0を、タンパク質100mgに対し1mlになるように加えて氷上で30分間攪拌し、膜画分を洗浄した。これを先と同様の条件で超遠心分離し、得られた洗浄膜画分を1%(w/v)トライトンX-100 5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2MKCl 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0を、タンパク質10mgに対し1mlになるように加えて氷上で30分間攪拌し、可溶化した。これを超遠心分離して不可溶化成分を除去し、可溶化膜画分を得た。こうして得た可溶化膜画分を0.1%(w/v)Triton X-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0で一晩透析する。透析したサンブルセル1.1%(w/v)トライトンX-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0(=平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel DEAE-TOYOPEARL 650M(東ソー株式会社)に吸着させた。このカラムに1%(w/v)トライトンX-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0を750ml流した後、0~0.1MKClを含む0.1%(w/v)トライトンX-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。これで得られた活性画分を0.2%(w/v)トライトンX-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な変形型PQQGDH蛋白質が得られる。

## 【0012】実施例3

## 酵素活性の測定

酵素活性の測定は0.2%(w/v)トライトンX-100 10mMリン酸緩衝液 pH 7.0においてPMS(フェナジンメトサルフェート)-DCIP(2,6ジクロロフェノールインドフェノール)を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1μmolのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM<sup>-1</sup>とした。測定には分光光度計UV-1200(島津製作所製)を用いた。

## 【0013】実施例4

## 基質特異性の検討

適量当量の精製酵素を5μMPQQ、10mM MgCl<sub>2</sub>、存在下で1時間以上ホロ化した。これを187μlずつ分注し、3μlの活性試薬(6mMDCIP 48μl, 600mM PMS 8μl, 0.2%トライトン10mMリン酸緩衝液 pH 7.0 16μl)と各濃度の基質溶液10μlを加え、実施例3に示す方法で酵素活性を測定した。

## 【0014】実施例5

## グルコースの分析

変形型PQQGDHを用いてグルコースを分析した実施例を図1に示す。方法は上述の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600nmの吸光度の変化を指標とした。図1に示されるように、変形型PQQGDHを用いることにより、グルコースの定量が行なえる。

## 【0015】

## 【表1】 改変型酵素の基質特異性

基質	相対活性			
	E.coli由来PQQGDH	H775N	H775D	H775K
D-グルコース	100%	100%	100%	100%
D-マンノース	30%	1%	0%	0%
D-ガラクトース	38%	2%	0%	6%
D-キシロース	48%	4%	1%	16%
マルトース	14%	5%	3%	23%

## 【0016】

【表2】 変異導入に用いたターゲットプライマーの塩基配列

H775N 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTT-ACC-GCC-TGC-GG-3'

H775D 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTC-ACC-GCC-TGC-GG-3'

H775S 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GGA-ACC-GCC-TGC-GG-3'

H775Y 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTA-ACC-GCC-TGC-GG-3'

H775K 5'-CC-AAA-TGA-ACC-TTT-ACC-GCC-TGC-GG-3'

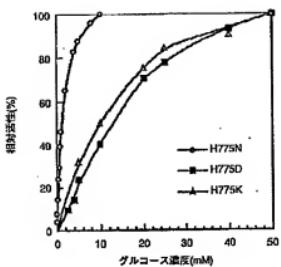
なお、この表に示したターゲットプライマーは当該遺伝子の相補鎖に相当する塩基配列を有し、3'側のTGC-3'から5'側の5'-AAAまでが772番目Alaから778番目のPheまでのコドンの相補鎖である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係る変形型PQQGDHの酵素活性とグル

コース濃度との相関を示す図。

【図 1】



## フロントページの続き

(51) Int.CI.\*

識別記号

F I

//(C 1 2 N 15/09

ZNA

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:19)

L1 ANSWER 2 OF 2 WPINDEX COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN  
AN 1998-549782 [47] WPINDEX  
DNC C1998-164473  
TI Modified glucose dehydrogenase - allows sensitive and selective quantitative determination of glucose.  
DC D16 D17  
IN SODE, K  
PA (HAYA-I) HAYADE H; (LIFE-N) LIFESCAN INC  
CYC 2  
PI JP 10243786 A 19980914 (199847)\* 5 C12N015-09 <-  
US 6103509 A 20000815 (200041) C12N009-04  
ADT JP 10243786 A JP 1997-61727 19970303; US 6103509 A US 1997-923109 19970904  
PRAI JP 1997-61727 19970303  
IC ICM C12N009-04; C12N015-09  
ICS C07H021-04; C12N001-21; C12Q001-32  
ICI C12N015-09, C12R001:19; C12N001-21, C12R001:19; C12N009-04, C12R001:19  
AB JP 10243786 A UPAB: 19981125  
A gene encoding a modified PQQDH enzyme protein or a plasmid containing the gene in which 775th histidine residue in 772nd-778th amino acid sequence of Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe of glucose dehydrogenase (GDH) with a coenzyme of pyrroloquinoline quinone (PQQ, methoxatin) derived from Escherichia coli is replaced with an amino acid residue of Asn, Asp, Ser, Tyr or Lys is new. Also claimed a modified PQQGDH enzyme protein produced with the modified PQQGDH structural gene.  
ADVANTAGE - The products allow highly sensitive and selective quantitative determination of glucose.  
Dwg. 0/1  
PS CPI  
FA AB  
MC CPI: D05-A02C; D05-H09; D05-H12B; D05-H12E; D05-H17B3; D06-G